Caracterització histològica i genètica de *Perkinsus mediterraneus* de les Illes Balears a diferents espècies de mol·luscs bivalves

José Mª VALENCIA, Marta BASSITTA, Antònia PICORNELL,
Cori RAMON i José Aurelio CASTRO

SHNB

SOCIETAT D'HISTÒRIA
NATURAL DE LES BALEARS

Valencia, J. Mª, Bassitta, M., Picornell, A., Ramon. C. i Castro, J.A. 2016. Caracterització histològica i genètica de *Perkinsus mediterraneus* de les Illes Balears a diferents espècies de mol·luscs bivalves. *Boll. Soc. Hist. Nat. Balears,* 59: 9-33. ISSN 0212-260X. Palma de Mallorca.

Perkinsus mediterraneus infecta, sense mortalitats associades, ~~a~~ una gran varietat de mol·luscs bivalves a l'arxipèlag balear: *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae*, *Chamelea gallina*, *Pinna nobilis* i *Venus verrucosa*. La detecció de *Perkinsus* spp. s'ha realitzat mitjançant RFTM i la determinació de l'espècie per PCR-RFLP i seqüenciació. Els nostres resultats han indicat l'existència a Balears de 12 haplotips *de P. mediterraneus* amb una elevada similitud genètica. Les anàlisis filogenètiques han detectat tres grups diferents d'*O. edulis* a l'illa de Menorca, que es diferencien d'altres llinatges coespecífics. Les anàlisis recolzen aquesta diferenciació entre les poblacions de Menorca i Mallorca, la qual sembla, en bona part deguda a l'aïllament geogràfic del port de Maó. Malgrat això, altres factors, com la variabilitat ambiental, diferents localitats i dates de detecció, la translocació d'animals, l'activitat humana, etc. poden tenir certa influència. Malgrat que hi ha co-infeccions a l'escopinya gravada del port de Maó amb *P. olseni* i *P. mediterraneus*, no n'hem trobat cap cas, ni tampoc bivalves afectats per *P. chesapeaki*, espècie que recentment s'ha detectat al delta de l'Ebre. Amb aquest treball es determina la distribució geogràfica de *P. mediterraneus*, les espècies afectades, la seva variabilitat genètica, la seva prevalença i la dinàmica de la infecció.
Paraules clau: *Perkinsus mediterraneus, mol·luscs bivalves, Illes Balears, Espaiador transcrit intern, RFTM, RFLP, Arbres filogenètics, Hipnòspores, Trofozoïts*.

PERKINSUS MEDITERRANEUS HISTOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERIZATION IN SEVERAL BIVALVE SPECIES FROM BALEARIC ISLANDS. A wide bivalve mollusc variety is infected by *Perkinsus mediterraneus* in Balearic Islands: *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae*, *Chamelea gallina*, *Pinna nobilis* and *Venus verrucosa. Perkinsus* spp. search was performed using RFTM and species was established by PCR-RFLP and sequencing. We have found 12 *P. mediterraneus* haplotypes, all of them sharing a high similarity. Three groups of *O. edulis* from Minorca were revealed by phylogenetic analyses which are different from other co-specifics lineages. Analysis supported this differentiation among populations from Minorca and Majorca. This differentiation could be due to Mahon harbour geographic isolation. Nevertheless, other factors, such as environmental variability, different detection locations and dates, animal translocations, human activity, etc., might also have some influence. Although it is known that co-infections between *P. olseni* and *P. mediterraneus* can happen in *Venus verrucosa* from Mahon harbour, we have not found any occurrence. Furthermore, we have not detected infection by *P. chesapeaki*, although it has been found in the Ebro delta. This work establishes distribution, affected species, their genetic variability, its prevalence and the infection dynamics by *P. mediterraneus.*

Key words: *Perkinsus mediterraneus, bivalve molluscs, Balearic Islands, Internal transcribed spacer, RFTM, RFLP, Phylogenetics trees, Hypnospores, Trophozoites.*

José Mª VALENCIA, Laboratori d'Investigacions Marines i Aqüicultura (LIMIA), Av. Enginyer Gabriel Roca, 69, Port d'Andratx, Illes Balears, 07158, Spain. jmvalencia@dgpesca.caib.es. Marta BASSITTA, Antònia PICORNELL, Cori RAMON, José Aurelio CASTRO, Laboratori de Genètica, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears, Campus de la UIB, Palma de Mallorca, Illes Balears, 07122, Spain.

Recepció del manuscrit: 15-juny-16; revisió acceptada:6-juliol-16.

Introducció

La perkinsosis és una malaltia epidèmica dels mol·luscs marins causada per protozous paràsits del gènere *Perkinsus*. S'han associat a mortalitats elevades de mol·luscs d'importància comercial al golf de Mèxic, a la costa atlàntica d'Amèrica del Nord (Andrews i Hewatt, 1957; Mackin i Hopkins, 1962; Burreson i Ragone Calvo, 1996; Ford, 1996; Soniat 1996), a la Columbia Britànica (Bower *et al.*, 1998), a la costa atlàntica del sud-oest d'Europa (Azevedo, 1989), al Mar Mediterrani (da Ros i Canonzier, 1985; Santmartí *et al.*, 1995), al sud d'Austràlia (Lester i Davis, 1981; Goggin i Lester 1995) i a les costes sud i oest de Corea (Choi i Park, 1997; Park i Choi, 2001). Diverses espècies de *Perkinsus* s'han descrit als mol·luscs però fins ara, només set han estat reconegudes com a vàlides. La taula 1 resumeix les set espècies descrites a mol·luscs, juntament amb l'espècie hoste tipus i altres espècies afectades.

Sis de les espècies de *Perkinsus* tenen característiques comunes però, *P. qugwadi*, responsable de la mortalitat de la vieira japonesa *Patinopecten yessoensis* al Canadà, té peculiaritats considerablement diferents de les altres espècies de *Perkinsus* (Bower *et al.*, 1998; Blackbourne *et al.*, 1998) (característiques moleculars, manca de desenvolupament d'hipnospores al medi fluït de tioglicolat de Ray (RTFM), no es tenyeix de blau o negre amb Lugol, les seves zoospores es poden desenvolupar dins de l'espai intersticial de l'amfitrió i són infectives a baixes temperatures) fins el punt que actualment, la seva inclusió en el gènere *Perkinsus* és controvertida (Casas *et al.*, 2002a).

A Europa s'han descrit tres espècies de *Perkinsus* (Fig. 1): *P. mediterraneus* i *P. olseni* (Casas *et al.*, 2004; Abollo *et al.*, 2006, Elandaloussi *et al.*, 2009; Valencia, 2010; Ramilo *et al.* 2010, Valencia *et al.*, 2014, Ramilo *et al.*, 2015) i recentment *P. chesapeaki* (Carrasco *et al.*, 2014). Fins a dia d'avui, *P. mediterraneus* sols s'ha localitzat a aigües del Mediterrani. S'han utilitzat com a eina de diagnòstic diferencial per discriminar les diferents espècies els polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció (PCR-RFLP), la PCR seguida de seqüenciació i la hibridació *in situ* (ISH).

Els objectius d'aquest treball són determinar la distribució geogràfica de *Perkinsus mediterraneus* a l'arxipèlag Balear, a les espècies de mol·luscs amb valor comercial o per a la conservació i caracteritzar la seva variabilitat genètica.

Materials i mètodes

Obtenció de mol·luscs

Es varen obtenir mostres d'escopinya gravada (*Venus verrucosa*), ostra (*Ostrea edulis,* musclo (*Mitylus galloprovincialis*),

Taula 1. Espècies de *Perkinsus*, hostes i referència bibliogràfica.
Table 1. *Perkinsus spp., hosts, location and citation.*

Espècie	Hoste tipus	Altres hostes	Àrees	Font
Perkinsus marinus	*Crassostrea virginica*	*Crassostrea gigas*, *C. ariakensis*, *C. rhizophorae*, *C. corteziensis*,*C. gasar*, *Mya arenaria*, *Macoma balthica*, *Saccostrea palmula*	USA, Hawaii, Brasil, Mèxic	Villalba *et al.* 2004, *Moss et al.* 2007, Dungan *et al.* 2007a, Caceres-Martínez *et al.* 2012, da Silva *et al.* 2013, da Silva *et al.* 2014, Escobedo-Fregoso *et al.* 2015.
Perkinsus olseni (= ***P. atlanticus***)	*Haliotis ruber*	*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Pitar rudis*, *Pitar rostrata*,*Paphia undulata*, *Tridacna* spp., *Protothaca jedoensis*; *C. ariakensis*, *C. hongkonngensis*,*C gigas*, *C.sikamea C. gasar*; *Pinctada margaritifera*, *P martensii;P. fucata*, *Haliotis laevigata*, *H. scalaris*, *H. cyclobates*, *H.rubra*	Australia, Nova Zelanda, Korea, Japó, Xina, Portugal, Espanya, Itàlia, Uruguai, Vietnam, Tailàndia, India, França.	Leethochavalit *et al.* 2004, Villalba *et al.* 2004, Park *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2005, Abollo *et al.* 2006, Park *et al.* 2006, Dungan *et al.* 2007b, Moss *et al.* 2007, Sheppard i Phillips 2008, Sanil *et al.* 2010, Arzul *et al.* 2012, da Silva *et al.* 2014.
Perkinsus chesapeaki (= ***P. andrewsi***)	*Mya arenaria*	*Macoma balthica*, *M. mitcheli*, *Mercenaria mercenaria*, *Tagelus plebeius*, *Crassostrea virginica*, *Cerastoderma edule*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Cyrtopleura costata*	USA, França, Espanya,	Villalba *et al.* 2004, Pecher *et al.* 2008, Reece *et al.* 2008, Arzul *et al.* 2012, Carrasco *et al.* 2014.
Perkinsus mediterraneus	*Ostrea edulis*	*Venus verrucosa*, *Arca noae*, *Mimachlamys varia*, *Chamalea gallina*, *Pinna nobilis*	Espanya, Itàlia	Casas *et al.* 2004, Moss *et al.* 2008, Ramilo *et al.* 2010, Valencia *et al.* 2014.
Perkinsus qugwadi	*Patinopecten yessoensis*		Canada	Bower *et al.* 1998.
Perkinsus honshuensis	*Ruditapes philippinnarum*		Japó	Dungan i Reece 2006.
Perkinsus beihaiensis	*Crassostrea hongkongensis*	*C. ariakensis*, *C. madrasensis* *Pinctada margaritifera*, *P martensii*, *Anomalocardia brasiliana*	Xina, India, Brasil	Moss *et al.* 2008, Sanil *et al.* 2012, Ferreira *et al.* 2014.

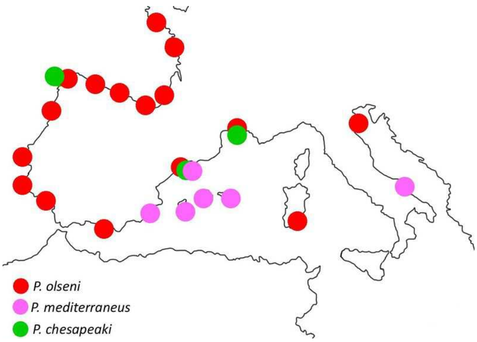


Fig. 1. Distribució de les espècies del gènere *Perkinsus* a Europa.
Fig. 1. *European distribution of* Perkinsus *spp.*

rossellona (*Chamelea gallina*), romera (*Mimachlamys varia*), nacra (*Pinna nobilis*), dàtil de mar (*Lithophaga lithophaga*), *Lima lima*, *Limaria inflata* i peu de cabrit (*Arca noae*) de 8 diferents localitats del litoral de les Illes Balears.

Una de les brànquies es va extraure per realitzar l'anàlisi RFTM i l'altre brànquia es va conservar en 95 % (v/v) d'etanol per a l'extracció de l'ADN i anàlisi mitjançant PCR. La resta del cos es va conservar per a l'examen histològic. En el cas de *Chamelea gallina*, els individus eren molt petits, i per

aquesta raó, una quarta part del cos es va emprar per a l'anàlisi RFTM, l'altre quart per a l'extracció d'ADN i la resta per a examen histològic.

Anàlisi histològica

Els cossos dels mol·luscs obtinguts varen ser fixat en formol tamponat al 10% durant una setmana. Una secció longitudinal d'aproximadament 5 mm de gruix es va tallar de la part mitjana del cos incloent mantell, gònades, glàndula digestiva, ronyó i peu. El tall es va fer segons el mètode de Howard i Smith (2004) (Fig. 2). Aquestes seccions es van deshidratar en sèries d'etanol, embegudes en paraplast i tallades a 4 micres. La preparació histològica es va tenyir amb hematoxilina-eosina de Harris i es va examinar sota microscopi òptic.

Extracció d'ADN

Les extraccions d'ADN dels teixits es van realitzar mitjançant el kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel) d'acord amb les instruccions del fabricant. La qualitat i quantitat d'ADN es va comprovar mitjançant un espectrofotòmetre *Nanodrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc).

Detecció de Perkinsus spp.

Les reaccions de PCR es van realitzar en un volum total de 20 µl que contenia 1 µl d'ADN genòmic (80 ng), 10 µl de *Taq Kapa Ready Mix DNA polymerase* (KapaBiosystems), 0,8 µl (20 mM) de cada encebador (Taula 2) i aigua per completar el volum final en un termociclador de gradient *Multigene* (Labnet).

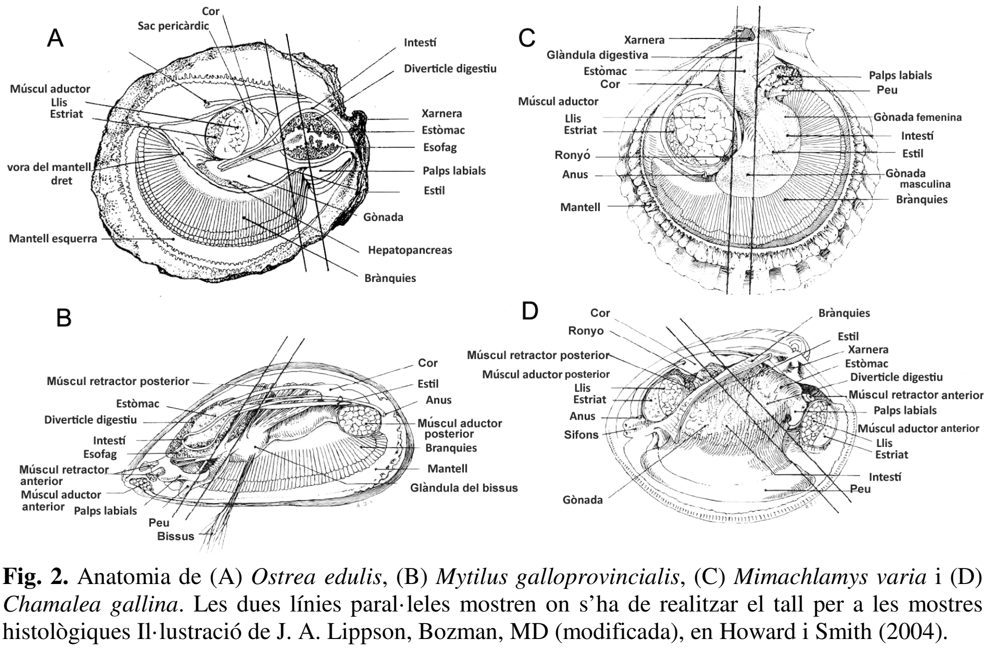


Fig. 2. Anatomia de (A) *Ostrea edulis*, (B) *Mytilus galloprovincialis*, (C) *Mimachlamys varia* i (D) *Chamalea gallina*. Les dues línies paral·leles mostren on s'ha de realitzar el tall per a les mostres histològiques Il·lustració de J. A. Lippson, Bozman, MD (modificada), en Howard i Smith (2004).

***Fig. 2.** Gross anatomy of (A) Ostrea edulis, (B) Mytilus galloprovincialis, (C) Mimachlamys varia and (D) Chamalea gallina. Parallel lines show where cross-section should be taken. Illustration by J. A. Lippson, Bozman, MD (modified), in Howard & Smith (2004).*

Taula 2. Descripció dels encebadors i dels seus usos.
Table 2. *Primer description and its uses.*

Encebador	Seqüència (5'→3')	Ús	Mida(bp)	Referència
PerkITS85	CCGCTTTGTTTGGA/CTCCC	Detecció Perkinsus	643	Abollo *et al.* 2006
PerkITS750	ACATCAGGCCTTCTAATGATG			

Les condicions d'amplificació per la regió ITS de *Perkinsus* varen ser: 94ºC durant 5 minuts, 35 cicles de 94ºC durant 45 s, 55ºC durant 45 s i 72ºC durant 1 min, seguit per 72ºC durant 10 min. Un control negatiu i un control positiu (ADN d'una ostra infectada amb *P. mediterraneus* del Port d'Andratx) es van incloure a totes les reaccions de PCR.

Els productes de la PCR foren visualitzats després d'electroforesi en gel d'agarosa al 1% o 2% amb tampó TAE i amb bromur d'etidi al 1% (p/v) o amb *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) mitjançant llum ultraviolada.

Els fragments positius per a *Perkinsus* spp. extrets del gels varen ser purificats emprant *Nucleospin Extract II PCR clean-up Gel extraction* (Macherey-Nagel).

Seqüenciació

Les seqüències es van obtenir emprant un *ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), i un analitzador genètic *ABI Prism 3130XL.*

Anàlisi filogenètica

Per determinar la filiació taxonòmica dels *Perkinsus* spp. aïllats dels bivalves, les seqüències obtingudes van ser analitzades utilitzant l'eina bàsica de cerca local d'alineació (BLAST), del Centre Nacional d'Informació Biotecnològica (NCBI) i es van alinear juntament amb les seqüències disponibles per *Perkinsus* spp. a la base de dades GenBank utilitzant l'algoritme CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, *1*994) del paquet de programari BioEdit 7.1.3.0 (Hall 1999). El nombre d'haplotips i la diversitat nucleotídica es van calcular utilitzant el programari DnaSP 5 (Librado i Rozas, 2009).

A les anàlisis filogenètiques es van incloure les seqüències obtingudes de GenBank (N=53): *P. marinus a Crassostrea virginica:* AY295184, U07700, DQ370474; *P. marinus* a *Crassostrea corteziensis:* JQ266236, JQ266240; *P. marinus* a *Crassostrea rhizophorae* JX144357; *P. olseni* a *Ruditapes decussatus:* AF140295, AF369969, U07697, AF509333; *P. olseni a Ruditapes philippinarum:* DQ194979, FJ481986, AF473840; *P. olseni* a *Haliotis laevigata:* U07701; *P. olseni* a *Astrovenus stuthbury:* EF204081, EU293848; *P. mediterraneus a Ostrea edulis:* DQ370482 a DQ370492, AY487834 a AY48784; *P. qugwadi a Patinopecten yessoensis:* AF151528; *P. honshuensis* a *Ruditapes philippinarum:* DQ516696 a DQ516698, DQ516700, DQ516702; *P. beihaiensis* a *Crassostrea hongkongensis:* EU068080, EU068083, EU068090, EU068095, EU068107; *P. chesapeaki* a *Macoma balthica:* AF102171, AY305326, AY876302, DQ370504.

Els arbres filogenètics van ser arrelats respecte a la seqüència d'un dinoflagelat, *Dinophysis sacculus* (AY040583), perquè les dades moleculars donen suport a una estreta afinitat entre els dinoflagel·lats i les espècies del filum *Perkinsus* (Reece *et al.*, 1997; Siddall *et al.*, *1*997; de la Herrán *et al*, 2000; Murrell *et al.,* 2002; Saldarriaga *et al.*, 2003).

L'arbre filogenètic basat en el mètode estadístic Neigbor-Joining (NJ) es va realitzar utilitzant el programari MEGA

v.5.05 (Tamura *et al.*, 2011) amb 10.000 replicacions de *bootstrap* i valor de tall per a l'arbre de consens del 60%.

La distància genètica corresponent al nombre de substitucions de bases per lloc, fent la mitjana de totes els parells de seqüències es va calcular utilitzant el model de Tajima-Nei (Tajima i Nei, 1984) dins el programari MEGA v 5.05.

Una xarxa de parsimònia estadística (amb un límit de connexió del 95%) es va construir utilitzant les seqüències ITS de tots els *P. mediterraneus* mitjançant el programa TCS v.1.21 (Clement *et al.*, 2000), per tal d'examinar les relacions entre les seqüències.

L'Anàlisi de la Variància Molecular (AMOVA) es va realitzar usant el programari Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) agrupant els haplotips per illes.

Anàlisi de restricció

Una vegada coneguda la seqüència i amb finalitat de poder realitzar el diagnòstic d'una forma més ràpida, la determinació de l'espècie de *Perkinsus* que infecta el mol·lusc es va realitzar mitjançant PCR-RFLP (reacció en cadena de la polimerasa-Polimorfisme de longitud dels fragments de restricció), segons Abollo *et al.*, 2006.

L'anàlisi de restricció es va dur a terme en dues passes. La primera, en un volum final de 20 µl que contenia 10 µl del producte de la PCR (ADN obtingut en l'amplificació de l'ITS), 2 µl de tampó d'enzim, 1 µl d'enzim de restricció (*Rsa*I, Promega) i 7 µl d'aigua destil·lada esterilitzada. En la segona reacció, es va utilitzar 10 µl de la reacció anterior, 2 µl de tampó d'enzim, 1 µl d'enzim de restricció (*Hinf*I, Promega) i 7 µl d'aigua destil·lada esterilitzada. Les reaccions de digestió es van dur a terme durant 2 h a 37ºC amb posterior inactivació de l'enzim a 65ºC durant 20 minuts.

Per visualitzar els productes de la PCR i els patrons de restricció, alíquotes de 4 µl dels productes de la PCR i 4 µl de les mostres digerides es barregen amb 1 µl de tampó de càrrega i van ser sotmeses a electroforesi en un gel d'agarosa al 2% (agarosa Tipus I PB estàndard) amb *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) a 100 V durant 25 a 30 minuts. Es va incloure un marcador de pes molecular (Roche marcador de pes molecular XIII o *Norgen MiniSizer* 50 *pb ADN Ladder*). Tots els productes de la PCR i restriccions es van visualitzar sota llum UV.

Assaig RFTM

L'altra peça de les brànquies o la quarta part de tot el cos de *Chamalea gallina* es van incubar individualment en RFTM (Ray, 1966) suplementat amb cloramfenicol i nistatina durant una setmana a temperatura ambient en foscor per induir la transformació dels trofozoïts del paràsit en prezoosporangis de *Perkinsus*.

A continuació, les brànquies o el cos es van triturar parcialment en un portaobjectes amb un bisturí, es van tenyir amb solució de Lugol i s'observaren al microscopi òptic per estimar la intensitat de la infecció per *Perkinsus* spp., d'acord amb Ray (1954), modificat en Andrews i Hewatt (1957).

La prevalença de *Perkinsus* spp. es va calcular com el percentatge d'individus infectats en cada mostra. La intensitat mitjana (grau d'infecció) es va calcular com la intensitat mitjana entre els bivalves infectades de cada mostra (Andrews i Hewatt, 1957).

Resultats

Assaig RFTM

L'examen amb el microscopi òptic va mostrar esferes negres o blaves, amb unes mides d'entre 7,9 i 183 micres (n = 844,

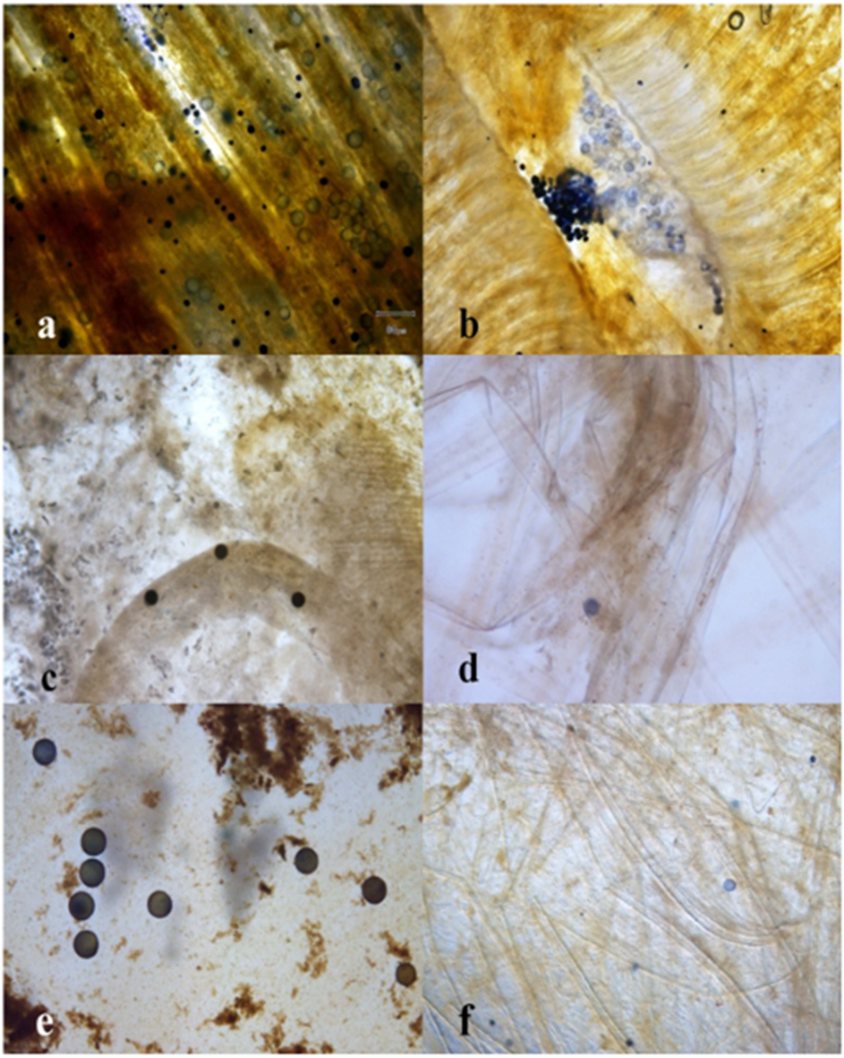


Fig. 3. Resultats de l'assaig RTFM: a) Hipnospores de *Perkinsus mediterraneus* en una infecció molt intensa en ostra, b) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció molt intensa en romera, c) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció lleugera en escupinya gravada, d) Hipnospores de *P. mediterraneus* en infecció lleugera en peu de cabrit, e) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció lleugera en nacra i f) Hipnospores de *P. mediterraneus* en una infecció lleugera en rossellona.

Fig. 3*. Ray's fluid thioglycolate medium (RFTM) assay. a)* Perkinsus mediterraneus *hypnospores in very heavy infection in* Ostrea edulis*; b)* P. mediterranus *hypnospores in very heavy infection in* Mimachlamys varia*; c)* Perkinsus *hypnospores in light infection in* Venus verrucosa*; d)* P. mediterranus *hypnospores in light infection in* Arca noae*; e)* P. mediterraneus *hypnospores in light infection in* Pinna nobilis*; f)* P. mediterraneus *hypnospores in light infection in* Chamalea gallina.

Taula 3. Resum dels resultats obtinguts de l'assaig RTFM de les mostres recollides a les Illes Balears.
Table 3. *RFTM assay results obtained from samples collected in Balearic Islands.*

Localitat	Espècie	Data	Núm.	Prevalènça	Grau d'infecció	Mida
Andratx	*A. noae*	*09/2011*	20	40,0%	1,26	44,55±5,15
Andratx	*A. noae*	*09/2012*	30	53,3%	0,80	50,29±5,88
s'Arenal	*C. gallina*	*09/2012*	24	25,0%	0,25	20,40±0,82
s'Arenal	*C .gallina*	*06/2013*	20	0 %	0,00	17,88±2,16
Andratx	*L. lima*	*09/2013*	3	67%	0,67	35,36±14,44
Andratx	*L. inflata*	*09/2013*	13	38%	0,38	30,04±6,51
Andratx	*M. varia**	*09/2011*	25	60,0%	0,87	34,52±7,81
Andratx	*M. varia**	*09/2012*	25	84,0%	2,44	33,16±4,71
Andratx	*M. varia**	*09/2013*	30	83,3%	2,40	41,97±6,66
Andratx	*M. varia**	*10/2013*	14	100%	2,36	34,49±4,69
Andratx	*M. galloprovincialis**	*09/2012*	30	0%	0,00	50,29±5,88
Andratx	*O. edulis*	*09/2011*	8	62,5%	1,37	74,66±9,960
Andratx	*O. edulis*	*09/2012*	6	50,0%	1,75	69,96±18,55
Andratx	*O. edulis*	*09/2013*	6	50,0%	0,67	87,40±14,56
Fornells	*O. edulis*	*09/2010*	13	53,8%	0,77	86,52±11,98
Eivissa	*O. edulis*	*11/2011*	18	61,1%	s/d	84,79±33,83
Maó	*O. edulis*	*09/2007*	32	78,1%	2,01	99,14±11,64
Maó	*O. edulis*	*09/2007*	30	70,0%	1,43	94,14±11,64
Maó	*O. edulis*	*11/2007*	30	43,3%	0,73	88,47±18,89
Maó	*O. edulis*	*02/2008*	30	6,7%	0,07	89,46±12,98
Maó	*O. edulis*	*03/2008*	30	6,7%	0,07	91,65±5,52
Maó	*O. edulis*	*10/2008*	30	50,0%	1,10	84,11±15,53
Maó	*O. edulis*	*11/2008*	30	13,3%	0,23	96,56±17,24
Palmanova	*O. edulis*	*09/2010*	18	27,8%	1,14	90,67±19,00
Portocristo	*O. edulis*	*09/2010*	15	60,0%	0,78	33,03±4,23
Andratx	*P. nobilis*	*06/2011*	6	66%	1,00	487,55±79.53
Andratx	*P. nobilis*	*10/2011*	11	100%	2,00	484,60±91.12
Cabrera	*P. nobilis*	*05/2011*	10	0%	0,00	421,98±100,72
Cabrera	*P. nobilis*	*06/2011*	10	50%	0,20	395,67±151.77
Cabrera	*P. nobilis*	*07/2011*	10	60%	1,10	414,24±128,22
Cabrera	*P. nobilis*	*08/2011*	11	60%	0,70	376,84±133,47
Cabrera	*P. nobilis*	*09/2011*	10	100%	1,70	408,81±103.63
Cabrera	*P. nobilis*	*10/2011*	9	30%	0,40	476,57±70,84
Cabrera	*P. nobilis*	*11/2011*	10	0%	0,00	381,71±212,53
Cabrera	*P. nobilis*	*01/2012*	10	0%	0,00	425,66±140,79
Cabrera	*P. nobilis*	*01/2012*	10	30%	0,33	435,30±151,47
Cabrera	*P. nobilis*	*02/2012*	10	30%	0,33	463,90±153,62
Cabrera	*P. nobilis*	*03/2012*	10	0%	0,00	429,20±166,05
Magalluf	*P. nobilis*	*06/2011*	5	0%	0	273,74±107,08
Magalluf	*P. nobilis*	*10/2011*	4	100%	3,25	327,27±89,01
Maó	*V. verrucosa*	*03/2007*	30	0,0%	0,00	42,28±4,29
Maó	*V. verrucosa*	*05/2007*	40	5,0%	0,08	44,43±2,10
Maó	*V. verrucosa*	*08/2007*	30	0,0%	0,00	45,04±2,39
Maó	*V. verrucosa*	*10/2007*	27	81,5%	1,41	41,87±2,34
Maó	*V. verrucosa*	*11/2007*	30	20,0%	0,27	48,13±3,36

Maó	*V. verrucosa*	*02/2008*	30	13,3%	0,13	43,24±1,89
Maó	*V. verrucosa*	*03/2008*	30	13,3%	0,13	44,02±2,03
Maó	*V. verrucosa*	*05/2008*	30	0,0%	0,00	45,79±2,10
Maó	*V. verrucosa*	*07/2008*	29	0,0%	0,00	42,87±2,38
Maó	*V. verrucosa*	*11/2008*	30	6,7%	0,07	42,50±4,87

mida mitjana= 59,020±40,267 µm) de diàmetre, que són hipnòspores típiques de *Perkinsus* spp., en *Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae*, *Chamalea gallina*, *Venus verrucosa*, *Lima lima*, *Limaria inflata* i *Pinna nobilis* (Fig. 3). No es van detectar hipnòspores en *Mytilus galloprovincialis.*

La prevalença va oscilar entre el 0% (*C. gallina*, *M. galloprovincialis*, *O. edulis*, *P. nobilis*, *V. verrucosa*) i 100 % (*M. varia* i *P. nobilis*). El grau d'infecció varia de 0 (*C. gallina*, *M. galloprovincialis*, *O. edulis*, *P. nobilis* i *V. verrucosa*) a 3,25 (*P. nobilis*) (Taula 3).

Els resultats de les anàlisis de RTFM es mostren a la Taula 3.

Estacionalitat

A les Illes Balears, la prevalença i la intensitat (grau d'infecció) de les infeccions de *P. mediterraneus* al medi natural es van determinar a l'escopinya gravada, l'ostra i la nacra a partir de les dades obtingudes dels assaigs RFTM. El grau d'infecció i la prevalença s'incrementen després del màxim anual de temperatura de l'aigua, principalment per setembre i octubre, per anar desapareixent segons es refreda (Fig. 4).

L'observació de les preparacions histològiques de romera obtingudes en els mostratges dels anys 2009 i 2010 recolzen els resultats dels assaigs RFTM (Fig. 5). El nombre d'individus infectats augmenta en setembre i octubre, mentre que la resta de l'any, es troben pocs individus infectats. A més, s'ha observat que els individus infectats a setembre i octubre estan més parasitats (presenten més rosetes de *Perkinsus mediterraneus,* Fig. 6b) que en els mesos més freds (Fig. 6a).

Anàlisi histològica

Setanta-sis preparacions histològiques provinents de 167 positius a l'assaig RFTM es varen observar amb un microscopi òptic (Taula 4). Només les infeccions de moderades a molt altes van ser visibles a les seccions histològiques d'*Ostrea edulis* i *Mimachlamys varia*. En el cas d'*Arca noae* també varen detectar-se trofozoïts a les infeccions lleus. Els trofozoïts varen mesurar entre 3,7 i 18,2 µm, amb una mitjana de 9,7 ± 3,69 µm (n = 885).

L'examen histològic d'*Ostrea edulis* infectades va revelar la presència de trofozoïts esfèrics encapsulats al teixit connectiu de l'hoste, amb l'aparença d'anell típic de 4-7 µm de diàmetre, amb un gran vacúol i el nucli en posició perifèrica amb un nuclèol patent, a més d'alguna roseta incipient (Fig. 7a).

A les preparacions d'*Arca noae* i *Mimachlamys varia* infectades, es van veure fases multicel·lulars encapsulades (rosetes) al teixit connectiu de diferents òrgans (glàndula digestiva, brànquies, mant i gònades) envoltats d'hemòcits o per material fibrós (Fig. 7b,d).

Aquestes rosetes poden ser empaquetaments laxos (Fig. 7d), envoltats (Fig. 7c) o no per una paret i en aquest cas, els trofozoïts adopten formes esfèriques o semiesfèriques, mentre que en empaquetaments densos, els trofozoïts adopten formes allargades (Fig. 7b,d).

En ambdós casos, els trofozoïts presenten un gran vacúol central, el nucli perifèric amb un nuclèol i en ocasions, es

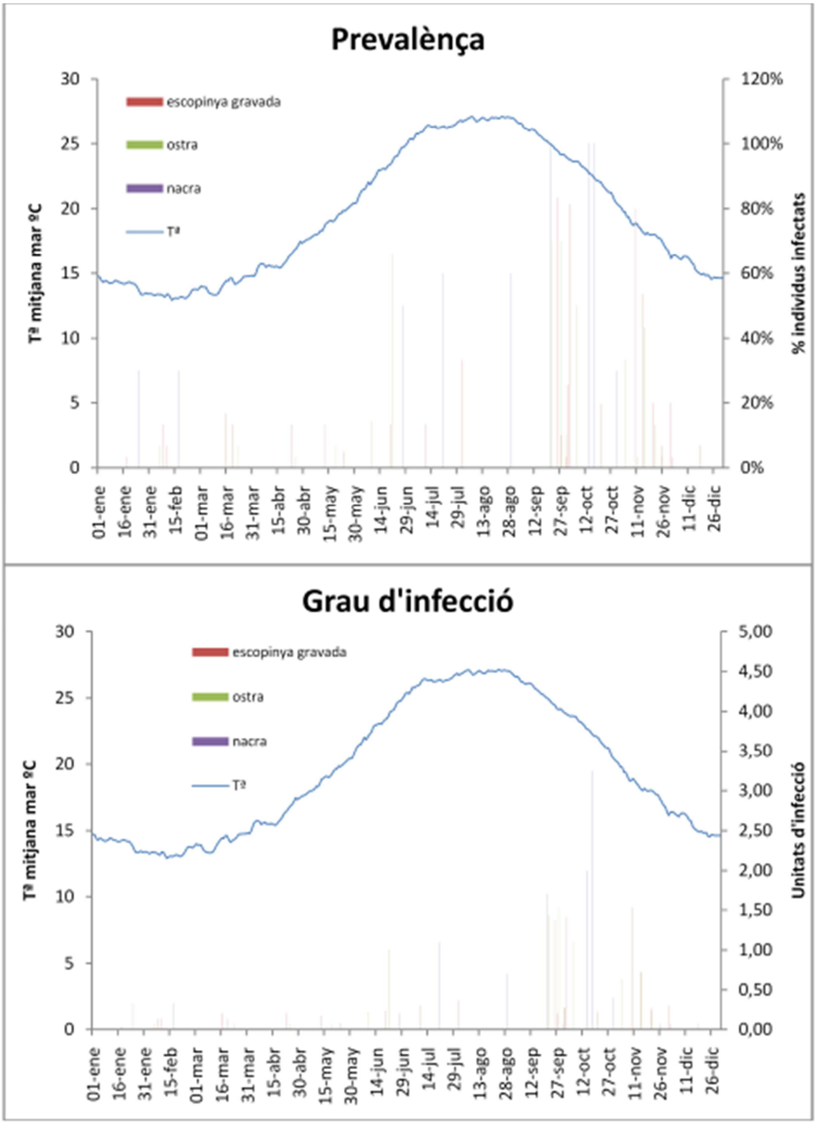


Fig. 4. Esquema anual de prevalença d'infecció i grau d'infecció de *P. mediterraneus*, basat en la informació obtinguda dels assaigs RFTM. Es representa a l'eix principal d'ordenades la temperatura mitjana de l'aigua del mar entre 2007 i 2013, mentre que al secundari es representen la prevalença o el grau d'infecció de l'escupinya gravada, l'ostra i la nacra.

Fig. 4. *Annual* P. mediterraneus *prevalence and infection degree scheme, based on information obtained in RTFM assays. Main ordinates axis represent seawater average temperature between 2007 and 2013, while the secondary represents prevalence or infection degree recorded in* Venus verrucosa, Ostrea edulis *or* Pinna nobilis.

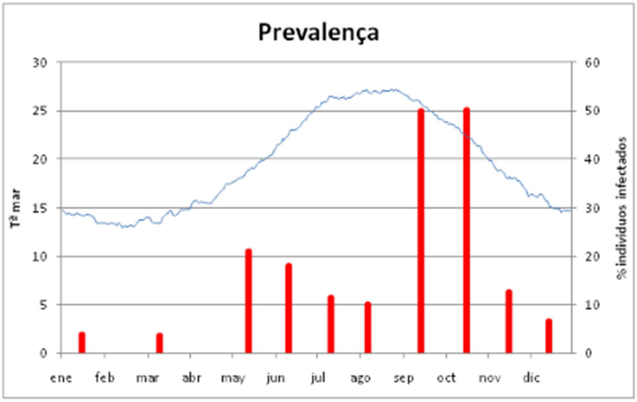


Fig. 5. Relació entre la temperatura mitjana del mar (ordenades, eix principal) i el percentatge de *Mimachlamys varia* infectades (ordenades, eix secundari) basat en l'observació de mostres histològiques.
Fig. 5. *Relationship between seawater average temperature (main ordinates axis) and the percentage of infected (ordinate secondary axis) based on the observation of histological slides.*

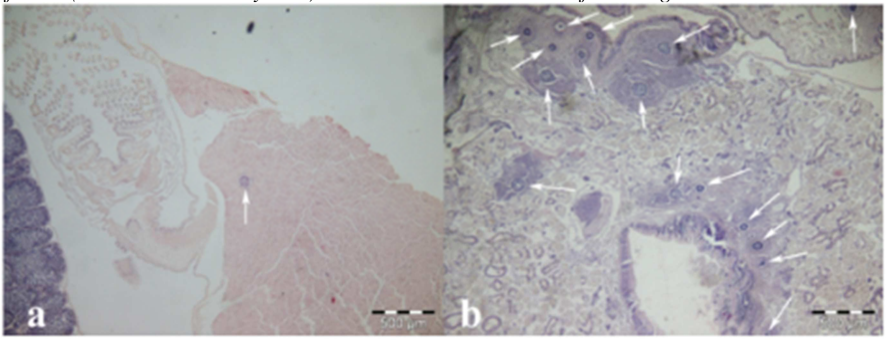


Fig. 6. a) Infecció poc intensa de *P. mediterraneus* en *M. varia* (gener). Sols es va observar una roseta a tot l'individu (fletxa)**.** b) Infecció intensa (octubre) on s'observen 15 rosetes (fletxes). A aquesta preparació histològica es van contar 54 rosetes en total.
Fig. 6. *a)* P. mediterraneus *light infection in* M. varia *(January). Only a rosette was observed in the slide (arrow). b) Intense infection (October). In the photograph there are more than 15 rosettes (arrows). In this histological slide was observed 54 rosettes.*

Espècie	**Localitat**	**Positius en RFTM**	**Negatius en histologia**	**Positius en histologia**
Ostrea edulis	Palmanova	4	4	0
	Badia de Fornells	8	7	1
	Port d'Andratx	8	6	2
Mimachlamys varia	Port d'Andratx	26	8	18
Arca noae	Port d'Andratx	22	10	12
Chamelea gallina	S'Arenal	6	6	0
	Total	**76**	**53**	**23**

Taula 4. Resultats de la revisió histologica dels positius detectats mitjançant incubació en RFTM (medi tioglicolat Fluid de Ray).
Taula 4. *Results of the histological survey. RTFM: Ray's fluid thioglycolate medium.*

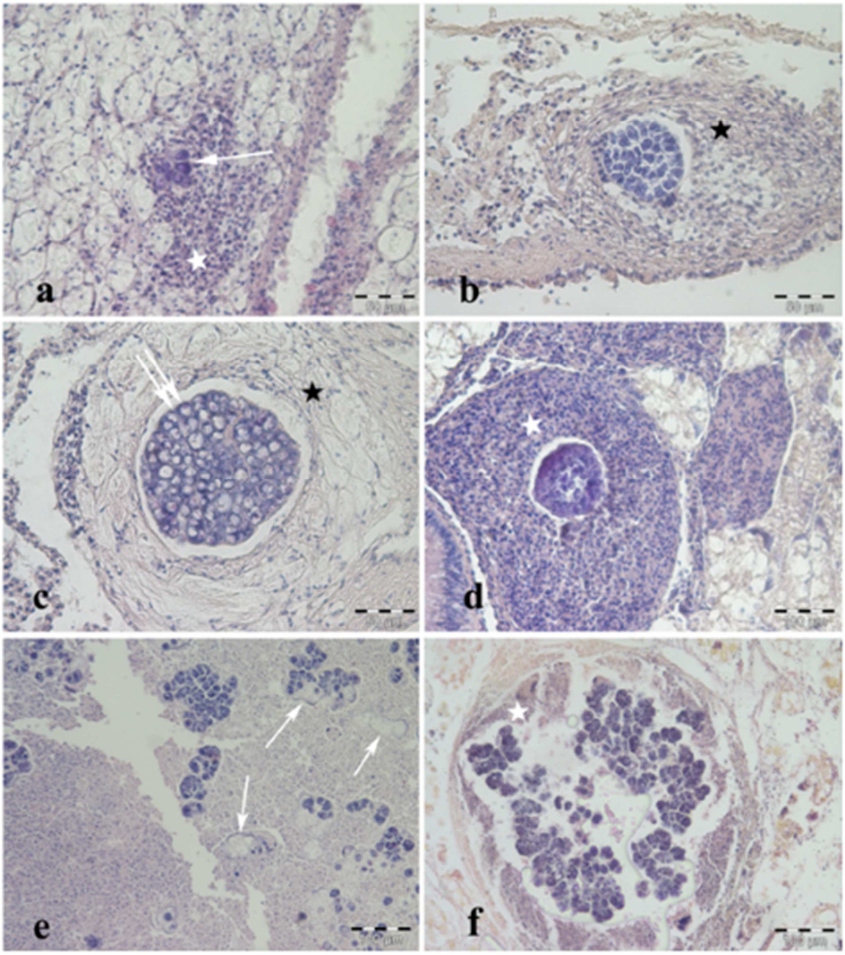


Fig. 7. a) Trofozoïts (indicats per una fletxa) de *Perkinsus mediterraneus* en *Ostrea edulis* 40x, l'estel indica un granuloma; b) etapa multicel·lular de *P. mediterraneus*, resultat de la multiplicació vegetativa dels trofozoïts, que donen lloc a una roseta (cist) en *Arca noae* envoltada per material fibrós (estel) 40x; c i d) Cist en *Mimachlamys varia*; la doble fletxa assenyala la paret, l'estel negre l'embolcall de material fibrós i el blanc, un granuloma d'encapsulació 40x i 20x respectivament; e) Infecció intensa en *M. varia*. Les fletxes indiquen trofozoïts moribunds 20x; f) Empaquetament poc dens de *P. mediterraneus* en *M. varia* 20x. Tinció hematoxilina-eosina.

Fig. 7. *a) Trophozoites (arrow) of* Perkinsus mediterraneus *in* Ostrea edulis *40x, stra indicates a granuloma; b) multicellular stages of* P. mediterraneus *resulting from vegetative multiplication of mother cells with daughter cells in a rosette-like arrangement (cyst) in Arca noae (double arrow) surround by fibrous material enclosing the cyst (star); c, d) cysts in* Mimachlamys varia*; the double arrow indicates the rossete-like wall, black star in c shows fibrous material wrap and the white star in d an encapsulation granuloma 40x & 20x respectively; e) Intense infection in* M. varia*. Arrows indicate dying trophozoites 20x; f)* P. mediterraneus *loose packaging in* M. varia *20x. Haematoxylin & eosin staining.*

pot apreciar un vacuoplast (Fig. 7). El nombre de trofozoïts en les rosetes ha estat variable, contant-se més de 135 en una mostra histològica de *M. varia.*

No es van observar trofozoïts o rosetes en les preparacions histològiques de *Chamalea gallina* ni en *Pinna nobilis*.

PCR i PCR-RFLP

Els positius obtinguts després del cultiu en medi fluït de tioglicolat de Ray (RFTM) es van amplificar mitjançant PCR. Per determinar l'espècie de *Perkinsus* es va emprar la clau taxonòmica descrita en Abollo *et al.* (2006). El parell d'encebadors PerkIts van produir amplicons d'aproximadament 700 pb de la regió ITS (Fig. 8a). Per determinar l'espècie de *Perkinsus*, els fragments amplificats es varen digerir amb enzims de restricció.

Els patrons de restricció obtinguts amb l'enzim *Rsa*I ens permeten distinguir entre *P. cheasapeaki*, *P. marinus* i *P. olseni/P. mediterraneus*. El resultats obtinguts a totes les mostres va ser dues bandes d'aproximadament 193 i 74 pb més un fragment d'aproximadament 400-410 pb que s'ajusten al patró de *P. olseni/P. mediterraneus*. Per diferenciar entre aquestes espècies es va realitzar una digestió amb l'enzim *Hinf*I. El patró obtingut a totes les nostres mostres amb aquesta digestió subsegüent va ser quatre fragments, un doblet de 192-179 i un altre de 162-149 pb, típic de *P. mediterraneus* (Fig. 8b).

Les seqüències de nucleòtids de la regió ITS obtingudes en aquest estudi (N=51) es van remetre al GenBank amb els números d'accés KJ569310 fins a KJ569360 (Fig. 9).

Anàlisis de seqüències

Es varen detectar dotze haplotips diferents entre els 51 individus de *P. mediterraneus* seqüènciats (diversitat d'haplotips, Hd = 0,646 ± 0,075) (Taula 5). L'haplotip més freqüent (anomenat H03) es va observar a totes les espècies d'hostes infectats i localitats. La diversitat nucleotídica va ser baixa (π) (0,00171 ± 0,00029), amb només vuit posicions polimòrfiques (totes elles són transicions) (Taula 5).

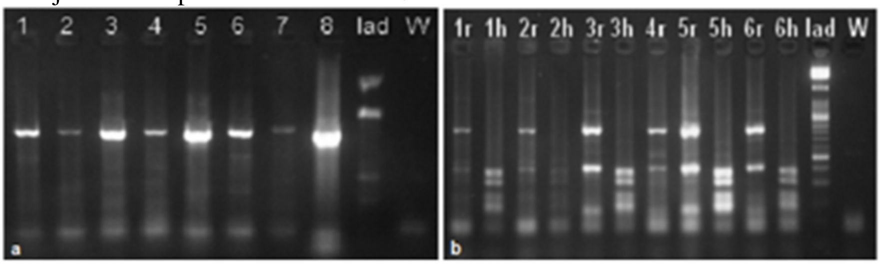


Fig. 8. Patrons dels productes de PCR obtinguts d'ostres infectades amb *Perkinsus mediterraneus.* Línees 1 a 7: Fornells; Línia 8: control positiu de *P. mediterraneus*; lad: Roche molecular weight marker XIII; W: control negatiu. (a) Productes de PCR. (b) Patrons de RFLP dels productes de PCR obtinguts. r: digestió amb *Rsa*I; h: digestió posterior amb *Hinf*I. Els nombres de línies es corresponen amb (a).

Fig. 8. *PCR patterns from oysters infected with* Perkinsus mediterraneus. *Lanes 1 to 7: Fornells Bay; Lane 8: positive control; lad: Roche molecular weight marker XIII; W: negative control. (a) PCR products. (B) Restriction (RFLP) patterns, digestion with RsaI and HinfI. r: digestion with RsaI; h: subsequent digestion with HinfI. Lane numbers correspond with (a).*

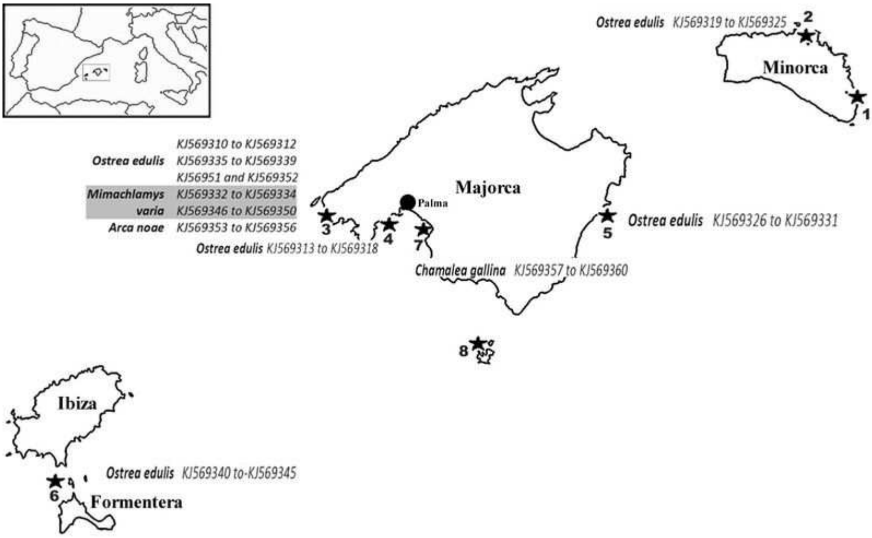


Fig. 9. Nombre d'accés, espècie infectada i localització de les seqüències de *Perkinsus mediterraneus* obtingudes: 1, Port de Maó; 2, Fornells; 3, Port d'Andratx; 4, Palmanova-Magalluf; 5, Porto Cristo; 6, Freu d'Eivissa-Formentera, 7, s'Arenal de Palma i 8, Cabrera.
Fig. 9. *Access number, infected species and location of the obtained sequences from* P. mediterraneus *1, Mahon harbour; 2 Fornells; 3 Andratx harbour; 4, Palmanova-Magaluf; 5 Porto Cristo; 6 Freu Ibiza-Formentera, 7 Palma beach and 8 Cabrera Island.*

Afegint les 21 seqüències del GenBank (números d'accés: DQ370482 a DQ370492 i AY487834 a AY487843), obtingudes en *O. edulis* del port de Maó, es completa el nombre d'haplotips trobats a l'espècie fins ara. El conjunt de seqüències mostraren 15 haplotips diferents, tres d'ells en comú amb els observats al present estudi: haplotip 3 (a 5 d'aquestes 21 seqüències) i haplotips 6 i 7 (cada un a un individu). Globalment es detectaren un total de 20 posicions polimòrfiques (18 transicions i 2 transversions) (Taula 5). Entre les seqüències de *Perkinsus* spp. obtingudes es dona una identitat del 99-100 %.

La Fig. 10 mostra una xarxa de parsimònia (TCS) que connecta totes les seqüències de *P. mediterraneus*. L'haplotip 3 (H03) ocupa una posició central; els altres haplotips deriven d'aquest, amb un màxim de sis passes mutacionals. Podem observar que els haplotips H15, H16 i H17 (del port de Maó, GenBank) i H07 (que es troba a Maó i a Porto Cristo) tenen una agrupació més propera. Els haplotips H22 i H24 també ho fan derivant del haplotip H14, tot tres de Maó.

L'arbre NJ basat en las seqüències de la regió ITS (Fig. 11) agrupen clarament les diferents espècies de *Perkinsus* (*P. olseni*, *P. marinus*, *P. mediterraneus*, *P. honshuensis*, *P. beihaiensis*, *P. chesapeaki* i *P qugwadi*) en distints clades recolzats per elevats valors de suport (*bootstrap* 62-100%). A més, dins del clade de *P. mediterraneus*, l'arbre va revelar l'existència dels dos grups ja descrits a l'anàlisi de TCS, un d'ells incloent els haplotips H07, H15, H16 i H17 (84 % de *bootstrap*) i el segon incloent dos haplotips del port de Maó H22 i H24 (69 % *bootstrap*). També es va detectar un tercer

Taula 5. Posicions dels nucleòtids polimòrfics de les seqüències ITS1-5.8S-ITS2 de *Perkinsus mediterraneus* dels mol·luscs recol·lectats a les Illes Balears. L'haplotip més freqüent, el nombre 3, va ser utilitzat com a base. Les transversions s'indiquen com a columnes grises i les transicions, en blanc. Els haplotips 1 a 12 es van obtenir a partir de les seqüències obtingudes en aquest treball. Del 13 a 24, a partir de seqüències dipositades al Genbank.

Table 5. Polymorphic nucleotide positions identified in the ITS1, 5.8S and ITS2 sequences of *Perkinsus mediterraneus* from shellfish collected in the Balearic Islands (*Ostrea edulis*, *Mimachlamys varia*, *Arca noae* and *Chamelea gallina*). The most frequent haplotype, 3, was used as the base. Transversions are marked as grey columns and transitions in white. Haplotypes 1 to 12 were obtained in this work; haplotypes 13 to 24 were obtained from GenBank data.

	ITS1				5.8S	ITS2																								
Haplotips	49	83	94	98	242	300	333	358	371	374	385	409	410	425	448	492	563	571	611	619	Núm d'individus afectats	*O. edulis* Port d'Andratx	*O. edulis* Palmanova	*O. edulis* Fornells	*O. edulis* Porto Cristo	*O. edulis* Ibiza	*M. varia* Port d'Andratx	*A. noae* Port d'Andratx	*C. gallina* Platja de s'Arenal	*O. edulis* Port de Maó (GenBank)
1										A	C	C									1	1								
2													T								1	1								
3	A	T	T	T	T	T	C	T	G	G	T	T	C	C	T	A	T	C	G	G	35	4	4	5	5	4	4	2	2	5
4												C									2		1				1			
5											C										2		1				1			
6												C						T			3	1		1						1
7						C	T									G					2				1					1
8										A											5	1			1	2			1	
9										A	C										2	1					1			
10																		T			3	1						2		
11							T				C										1	1								
12							T			A											1								1	
13	T														C						1									1
14										A	C		T								2									2
15		C				C	T									G			A		1									1
16						C	T									G			A		2									2
17						C	T	C								G					1									1
18				C																	1									1
19	T		C																		1									1
20									A			C								T	1									1
21	T				C				A								C				1									1
22	T									A	C		T							T	1									1
23	T										C										1									1
24	T									A	C		T	T							1									1

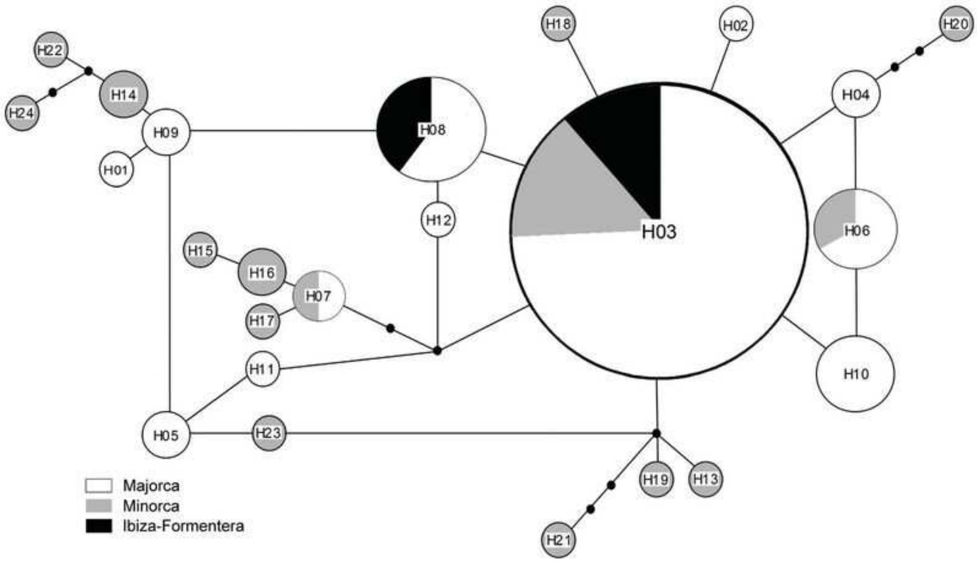


Fig. 10. Xarxa d'haplotips de la regió espaiadora de l' ITS de *P. mediterraneus*, obtinguda mitjançant el programari TCS, amb un límit de connectivitat del 95%. Cada línia representa una mutació simple. Els haplotips inferits que no s'han mostrejat, es mostren com a punts negres sobre els segments. La mida del cercle es proporcional a la freqüència de l'haplotip.
Fig. 10. *TCS haplotype network for the internal transcribed (ITS) spacer region sequences in* Perkinsus mediterraneus *ba sed on a 95% connection limit. Each line segment represents a single mutation. Inferred intermediate haplotypes that were not sampled are shown as small black dots on the line segments. Circle size is proportional to haplotype frequency.*

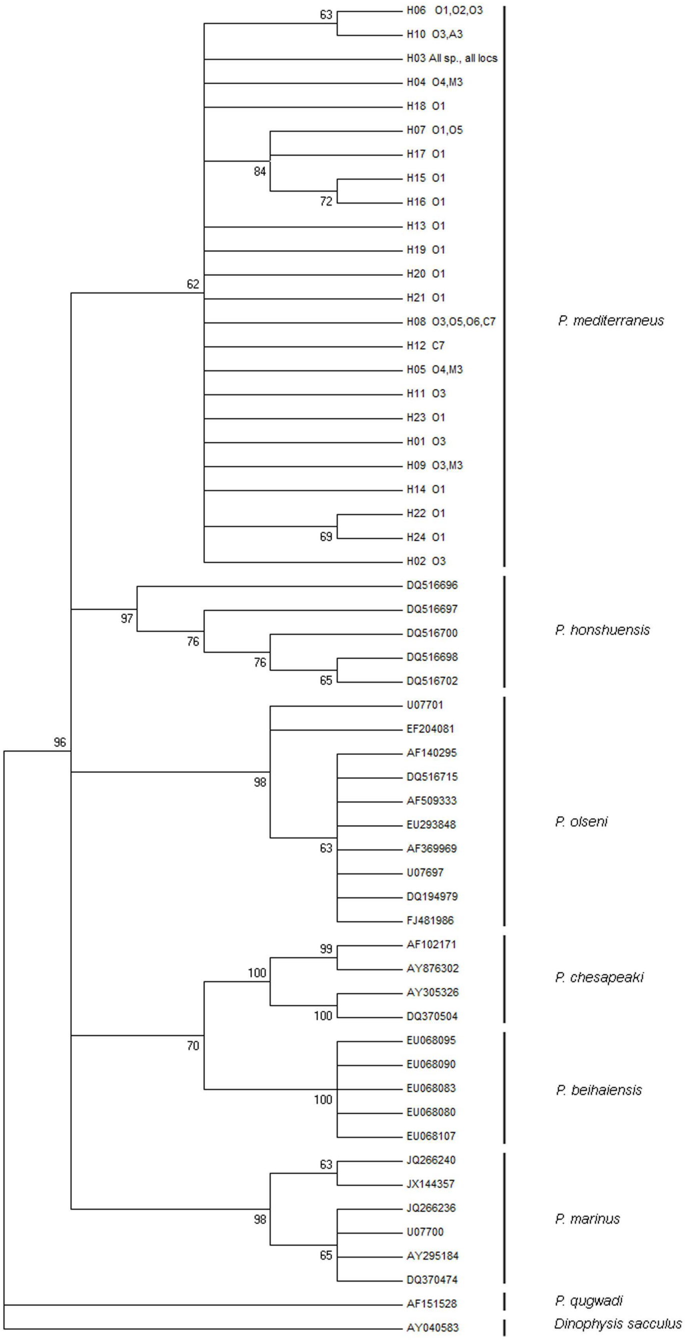
grup amb els haplotips 6 i 10 (63 % de *bootstrap*), que no apareix al TCS.

L'anàlisi d'AMOVA va mostrar un valor de F_{ST} (Índex de fixació) del 0,042, amb un valor de P igual a 0,028±0,005, determinant que un 4,14 % de la variabilitat genètica està associada a diferenciació entre poblacions, mentre que un 95,86 % s'atribueix a variació intrapoblacional (Taula 6).

La comparació entre les poblacions (*pairwise difference*) ofereix un valor significatiu entre les poblacions de Menorca (Maó i Fornells) i les de Mallorca (Andratx, Palmanova, Porto Cristo i s'Arenal), amb un valor de F_{ST} de 0,56 i de P<0,01. Els valors de F_{ST} obtinguts en les comparacions amb la població d'Eivissa no varen ser significatius, probablement per la baixa quantitat de mostres obtingudes a aquesta illa (Taula 7).

Discussió

Els resultats obtinguts demostren que *Perkinsus mediterraneus* infecta a una gran varietat de mol·luscs bivalves a l'arxipèlag balear: ostres, romeres, peus de cabrit, rossellones, nacres i escopinyes gravades. En el cas dels musclos no se detectaren infeccions, el mateix que succeeix a altres indrets, com a la llacuna de St. Gilla, Sardenya (Colurgioni *et al.*, 2006). Posteriorment a aquest estudi, s'ha ampliat el nombre d'indrets del Mediterrani occidental afectats per *P. mediterraneus*,



H06 O1,O2,O3
H10 O3,A3
H03 All sp., all locs
H04 O4,M3
H18 O1
H07 O1,O5
H17 O1
H15 O1
H16 O1
H13 O1
H19 O1
H20 O1
H21 O1
H08 O3,O5,O6,C7
H12 C7
H05 O4,M3
H11 O3
H23 O1
H01 O3
H09 O3,M3
H14 O1
H22 O1
H24 O1
H02 O3
DQ516696
DQ516697
DQ516700
DQ516698
DQ516702
U07701
EF204081
AF140295
DQ516715
AF509333
EU293848
AF369969
U07697
DQ194979
FJ481986
AF102171
AY876302
AY305326
DQ370504
EU068095
EU068090
EU068083
EU068080
EU068107
JQ266240
JX144357
JQ266236
U07700
AY295184
DQ370474
AF151528
AY040583
63
84
72
62
69
97
76
76
65
96
98
63
99
100
100
70
100
63
98
65
P. mediterraneus
P. honshuensis
P. olseni
P. chesapeaki
P. beihaiensis
P. marinus
P. qugwadi
Dinophysis sacculus

(Pàgina anterior)
Fig. 11. Arbre neighbor-joining (NJ) obtingut de l'analisi de l'ITS de *Perkinsus* spp. Els valors de bootstrap superiors al 60% es mostren a les branques. Per a *P. mediterraneus* s'indiquen els haplotips (H1 a H24); les lletres indiquen l'espècie de bivalve i el nombre, la localitat. O, *O. edulis*; M, *Mimachlamys varia;* A, *Arca noae; C, Chamelea gallina* i All sp., totes les espècies. 1 Port de Maó, 2 Badia de Fornells, 3 Port d'Andratx, 4 Palmanova, 5 Porto Cristo, 6 Ibiza-Formentera, 7 Platja de s'Arenal, All locs, totes les localitats.
Fig. 11. Neighbor-joining tree resulting from the analysis of the internal transcribed (ITS) of *Perkinsus* spp. Bootstrap values >60% are given on branches. For *P. mediterraneus* (H01 to H24) haplotypes, letters indicate the shellfish species and numbers indicate the location. O: *O. edulis*; M: *Mimachlamys varia*; A: *Arca noae*; C: *Chamelea gallina*. 1: Mahon Harbour; 2: Fornells Bay; 3: Andratx Harbour; 4: Palmanova; 5: Porto Cristo; 6: Ibiza-Formentera; 7: Arenal Beach.

Taula 6. Anàlisi molecular de la variància (AMOVA) usant les seqüències de l'ITS de *P. mediterraneus*. g.l., graus de llibertat; SSD, suma de les desviacions quadràtiques, CV, components estimats de la variància.
Table 6. *Molecular Variance Analysis (AMOVA) using* P. mediterraneus *ITS sequences g.l. degrees of freedom; SSD sum of the quadratic deviations, CV, estimated components of variance.*

Font de variabilitat	g.l	SSD	CV	% de variància
Interpoblacional	2	4,017	0,046	4,14
Intrapoblacional	69	73,622	1,067	95,86
Total	71	77,639	1,113	
Índex de fixació F_{ST} = 0,041			**P-valor = 0,028±0,005**	

Taula 7. Comparació aparellada entre poblaciones. Sobre la diagonal es mostren els valors de P i davall, els valors de l'índex de fixació (F_{ST}) basats en 1000 permutacions.
Table 7. *Comparison between paired locations. Above the diagonal are showing P values and below, the values of the fixation index (F_{ST}) based in 1000 permutations.*

	Mallorca	*Menorca*	*Eivissa*
Mallorca		0,00684±0,0027	0,64258±0,0155
Menorca	0,05622		0,45801±0,0179
Eivissa	-0,02871	-0,00416	

detectant-se mitjançant *hibridació in situ* a *O. edulis* al Golf de Manfredonia (sud d'Italia) i mitjançant PCR-RFLP a ostres i a *M. varia* a poblacions d'Alacant (est d'Espanya) (Ramilo *et al.*, 2015).

La perkinsosis és una greu amenaça pels cultius de bivalves a tot el món, amb dramàtiques conseqüències a molts indrets. Encara que es va detectar la presència de *P. mediterraneus* a les nostres mostres, no es van registrar mortalitats, tal i com succeeix amb altres espècies de *Perkinsus* a *Ruditapes decussatus* i *Cerastoderma glaucum* (Culurgioni *et al.*, 2006); amb *P. olseni* i *P. cheasapeaki* a cloïsses procedents de França (Arzul *et al.*, 2012) i amb *P. marinus* a *Crassostrea corteziensis* en Mèxic (Escobedo-Fregoso *et al.*, 2015). En el cas de *P. marinus* les diferències al seu impacte sobre els mol·luscs bivalves s'associen amb les variacions en els factors ambientals (Oliver *et al.*, 1998), la virulència entre els diferents genotips de *P. marinus* (Bushek i Allen, 1996), i la variabilitat genètica entre els diferents estocs d'ostres, que poden conduir a diferències a la resistència a *P. marinus* (Encomio *et al.*, 2005). Una combinació d'aquests factors podria explicar la resistència a la infecció de *P.*

mediterraneus dels bivalves analitzats a aquest estudi.

A aquesta investigació exposem dades relatives a la prevalença de *P. mediterraneus*, que es semblant a la d'altres espècies de *Perkinsus* (Dungan *et al.*, 2002; Colurgioni *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Sabry *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2013; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2015). La prevalença màxima fou del 100% en *Mimachlamys varia* (octubre de 2013) al Port d'Andratx i *Pinna nobilis* (Cabrera, setembre de 2011 i Port d'Andratx i Magalluf, octubre de 2011). El mínim (excloent *Mytilus galloprovincialis*, que sembla ser no susceptible a la infecció) va ser la no presencia en *Chamelea gallina*, *Ostrea edulis*, *Pinna nobilis* i *Venus verrucosa.* Aquesta es detectà preferentment als mesos més freds. En aquest sentit, la dinàmica de la infecció per *Perkinsus mediterraneus* és similar a la de *P. marinus* en la badia de Chesapeake, amb valors màxims de detecció del paràsit a ostres al setembre i octubre, després del màxim estival de temperatura, i regressió de la infecció a l'hivern, segons la temperatura de l'aigua va baixant. Aquesta disminució de la prevalença a l'hivern es deu a la regressió de la infecció, i a la persistència del paràsit a nivells indetectables amb les tècniques estàndard de diagnòstic (Ragone i Burreson, 1994; Burreson i Ragone Calvo, 1996). La prevalença és superior als individus amb més d'1 any d'exposició al patogen (Andrews, 1996; Burreson i Ragone Calvo, 1996; Soniat, 1996; Powell *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1999; Park i Choi, 2001; Villalba *et al.*, 2005). En el cas de *C. gallina* els individus recollits a la platja de s'Arenal tenien una mida de 20,4 ± 0,816 mm, fet que indica que la seva edat n'és aproximadament un any (Vizuete *et al.*, 1993). Aquesta és probablement la causa de la baixa prevalença i baix grau d'infecció d'aquesta població.

La detecció rutinària de les infeccions de *Perkinsus* spp. als mol·luscs es fa amb l'assaig RFTM. L'ús de mètodes histològics per detectar aquestes infeccions és poc fiable perquè l'especificitat del mètode histològic és baixa. La sensitivitat és bona per a infeccions moderades i intenses, però és baixa per infeccions lleus, com hem apreciat a les nostres mostres (OIE, 2015). Amb finalitat diagnòstica *P. mediterraneus* pot detectar-se mitjançant PCR-RFLP. Aquesta metodologia proporciona perfils de restricció compatibles amb *P. mediterraneus* en totes les àrees investigades i espècies de bivalves. Diversos estudis informen de l'èxit amb l'ús de la regió rADN-ITS als anàlisis filogenètics per al diagnòstic molecular de les diferents espècies de *Perkinsus* (Brown *et al.*, 2004; Burreson *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2002a; 2004; Dungan i Reece, 2006; Moss *et al.*, 2008; Sabry *et al.*, 2009; Sanil *et al.*, 2012). Al present estudi, ambdós mètodes mostraren la mateixa eficiència en la identificació de *P. mediterraneus*. No obstant això, el RFLP per si mateix podria no identificar correctament l'espècie, especialment per a un possible nou membre del gènere *Perkinsus*. Per tant, la seqüènciació del fragment ITS ha demostrat ser molt útil per assignar les diferents espècies de *Perkinsus* i per a la detecció de la variabilitat genètica.

En base a la variabilitat genètica observada, les topologies dels arbres filogenètics mostraren una estreta relació entre totes les espècies de *Perkinsus*, encara que cada una d'elles formen un grup monofilètic. Com també s'indica a la bibliografia, les seqüències de la regió ITS suggereixen que *P. mediterraneus* s'agrupa estretament amb *P. honshuensis*, *P. olseni* i *P. marinus*. *P. qugwadi* és el més divergent

mentre que *P. chesapeaki* i *P. beihaiensis*, que són les espècies més similars entre si, es troben en una posició intermèdia (Casas *et al.*, 2002b; Villalba *et al.*, 2004; Moss *et al.*, 2008) .

Les distàncies entre parells (*pairwise*) entre els nostres 12 haplotips fou del 0,40 %. Aquest valor va augmentar a 0,60 % en incloure les seqüències de *P. mediterraneus* del GenBank. Aquests valors estan dins del rang de les variacions intraespecífiques observades dintre de les espècies de *Perkinsus* actualment acceptades (Moss *et al.*, 2008). Aquests resultats recolzen el cicle de vida clonal típic d'aquests paràsits i descrits també a la literatura a altres espècies com *P. olseni* (Vilas *et al.*, 2011). Els mètodes d'inferència filogenètica emprats a aquest estudi, el TCS i l'arbre NJ detecten en conjunt tres grups diferents de *Perkinsus mediterraneus* en *O. edulis* de Menorca que es diferencien d'altres llinatges coespecífics. L'AMOVA recolza aquesta diferenciació entre les poblacions de Menorca i Mallorca, que sembla atribuïble a l'aïllament geogràfic del port de Maó i/o a la introducció d'ostres d'altres indrets (Grau *et al*., 1987, Grau, 1989), que podrien portar el paràsit. No obstant això, la segona opció sembla poc probable, doncs no s'ha detectat *P. mediterraneus* fora del Mediterrani Occidental (Abollo *et al*., 2006, Valencia *et al*, 2014, Ramilo *et al*., 2015). Altres factors, com la variabilitat ambiental, diferents localitats i dates de detecció, la translocació d'animals, l'activitat humana, poden tenir una certa influència (Oliver *et al.*, 1998; Bushek i Allen, 1996; Encomio *et al.*, 2005). En qualsevol cas, aquesta diferenciació indica qualque tipus d'aïllament d'aquestes mostres, i en aquest sentit, coneixem que a partir de 3 diferents cultius in vitro de *P. mediterraneus*, en concret PmG2, PmG3 i PmHt2, es varen obtenir 11 seqüències diferents (GenBank nombres d'accés DQ-370482- DQ370492), 4 de les quals corresponen als haplotips H15, H16 i H17 (Abollo *et al.*, 2006). És possible que les condicions *in vitro* afavoriren la diferenciació genètica dels *P. mediterraneus* cultivats (Dungan *et al.*, 2002).

Recents investigacions (Ramilo *et al.*, 2015), han demostrat l'existència de *Perkinsus mediterraneus* a altres indrets del Mediterrani occidental. En aquest sentit, les seqüències obtingudes a ostres i romeres de Santa Pola (Alacant), d'ostra al golf de Manfredonia (Italia) i d'escupinya a Maó, presenten haplotips compatibles amb els obtinguts al nostre treball (en concret, H03, H04 i H06). No obstant això, a tres escopinyes gravades de Maó, han aparegut tres nous haplotips. Aquest resultat referma l'aïllament de les poblacions de l'illa de Menorca.

La regió ITS de l'ADN ribosomal té tres seqüències diferents (ITS1, 5.8S i ITS2). Es va trobar una major variabilitat a les regions ITS1 i ITS2 que a la 5.8S. Aquesta darrera regió presenta únicament una transició en l'haplotip 21. No podem descartar que aquestes diferències en la variabilitat podria ser també una conseqüència de la importància i el bon estat de conservació de la seqüència 5.8S.

Al present estudi no hem trobat co-infecció amb dues espècies de *Perkinsus*, encara que s'han descrit a la bibliografia: *P. marinus* i *P. chesapeaki* en les ostres *Crassostrea virginica* a la badia de Chesapeake (NE USA)(Pecher *et al.*, 2008; Reece *et al.*, 2008); *P. marinus i Perkinsus* spp. a *C. virginica* (NE USA)(Pecher *et al.*, 2008); *P. olseni* i *P. chesapeake-like* a *R. decussatus* de Francia (Arzul *et al.*, 2012), o *P. olseni* i *P. mediterraneus* en *V. verrucosa* (Ramilo *et al.*, 2010).

No es va detectar disminució de les poblacions ni mortalitats anòmales a les

altres localitats investigades per causa de *P. mediterraneus*, tal com també succeeix amb *P. olseni* i *P. cheasapeaki* en les copinyes a França (Arzul *et al.*, 2012), i per *Perkinsus* spp. en *Ruditapes decussatus* i *Cerastoderma glaucum* a Italia (Culurgioni *et al.*, 2006). Malgrat això, estan descrites mortalitats causades per la perkinsosi a diferents indrets del món i considerant la intensitat de la seva prevalença i grau d'infecció a les poblacions de bivalves de les Illes Balears hauria d'establir-se un programa de monitoratge d'aquesta malaltia.

Referències

Abollo, E., Casas, S. M., Ceschia, G. i Villalba, A. 2006. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Mol. Cel. Probes*, 20, 323—329.

Andrews, J. D. i Hewatt W. G. 1957. Oyster mortality studies in Virginia. II. The fungus disease caused by *Dermocystidium marinum* in oysters of Chesapeake Bay. *Ecol. Monogr.*, 27, 1-26.

Andrews, J. D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res.*, 15, 13-16.

Arzul, I., Chollet, B., Michel, J., Robert, M., Garcia, C., Joly, J. P., François, C. i Miossec, L. 2012. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. *Parasitology*, 139 (13), 1757.

Azevedo, C. 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp.(Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *The Journal of parasitology*, 75(4), 627-635.

Blackbourne, J., Bower, S. M. i Meyer, G. R. 1998. Perkinsus qugwadi sp.nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, Patinopecten yessoensis, cultured in British Columbia, Canada. Can. J. Zool., 76, 942-953.

Bower, S. M., Blackbourn, J. i Meyer, G. R. 1998. Distribution, prevalence, and pathogenicity of the protozoan *Perkinsus qugwadi* in Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Can. J. Zool.*, 76, 954-959.

Brown, G. D., Hudson, K. L. i. Reece, K .S. 2004. Multiple polymorphic sites at the ITS and ATAN loci in cultured isolates of *Perkinsus marinus*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 51, 312-320.

Burreson, E. M. i Ragone Calvo, L. M. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *J. Shellfish Res.*, 15, 17-34.

Burreson, E. M., Reece, K. S. i Dungan, C. F. 2005. Molecular, morphological, and experimental evidence support the synonymy of *Perkinsus chesapeaki* and *Perkinsus andrewsi*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 52, 258-270.

Bushek, D. i Allen, S. 1996. Host-parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and the protozoan *Perkinsus marinus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 139, 127-141.

Cáceres-Martínez, J., Ortega, M. G., Vásquez-Yeomans, R., García, T. D. J. P., Stokes, N. A. i Carnegie, R. B. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of invertebrate pathology*, 110(3), 321-325.

Carrasco, N., Rojas, M., Aceituno, P., Andree, K. B., Lacuesta, B. i Furones, M. D. 2014. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule*, in the Spanish Mediterranean coast. *Journal of invertebrate pathology*, 117, 56-60.

Casas, S. M., Villalba, A. i Reece, K. S. 2002a. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by

temperature and salinity. *Diseases of aquatic organisms*, 50, 51-65.

Casas, S. M., La Peyre, J. F., Reece, K. S., Azevedo, C. i Villalba, A. 2002b. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of aquatic organisms*, 52(3), 217-231.

Casas, S.M., Grau, A., Reece, K.S., Apakupakul, K., Azevedo, C. i Villalba, A. 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of aquatic organisms*, 58(2/3), 231-244.

Choi, K. S. i Park, K. I. 1997. Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *J. Aquacult*., 10, 227-237.

Clement, M., Posada, D. i Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9(10), 1657-1660.

Culurgioni, J., d'Amico, V., de Murtas, R., Trotti, G.C. i Figus, V. 2006. Parasitological monitoring of commercial native bivalves from St. Gilla lagoon (Sardinia, South Western Mediterranean). *Ittiopatologia*, 3, 243-252.

da Ros, L. i Canonzier, W. J. 1985. *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, 5, 23-27.

da Silva, P. M., Vianna, R. T., Guertler, C., Ferreira, L. P., Santana, L. N., Fernández-Boo, S., Ramilo, A., Cao, A. i Villalba, A. 2013. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraiba River (NE, Brazil). *J. Invertebr. Pathol.*, 113(1), 96-103.

da Silva, P. M., Scardua, M. P., Vianna, R. T., Mendonça, R. C., Vieira, C. B., Dungan, C. F., Scott, G.P. i Reece, K. S. 2014. Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *Journal of invertebrate pathology*, 119, 62-71.

de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M.A., Navas, J. I., Ruíz-Rejón, C. i Ruíz-Rejón, M. 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. *Parasitology*, 120, 345-353.

Dungan, C. F., Hamilton, R. M., Hudson, K. L., McCollough, C. B. i Reece, K. S. 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. *Dis. Aquat. Org.* 50, 67-78.

Dungan, C. F. i Reece, K. S. 2006. *In vitro* propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 53, 316-326.

Dungan C. F., Reece, K. S., Hamilton, R.M., Stokes, N.A. i Burreson, E.M. 2007a. Experimental cross-infections by *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* in three sympatric species of Chesapeake Bay oysters and clams. *Dis. Aquat.Org.*, 76, 67-75.

Dungan, C.F., Reece, K.S., Moss, J.S., Hamilton, R.M. i Diggles, B.K. 2007b. *Perkinsus olseni in Vitro* isolates from the New Zealand clam *Austrovenus stutchburyi*. *J. Eukaryot. Microbiol*., 54, 263-270.

Elandaloussi, L., Carrasco, N., Furones, D. i Roque, A. 2009. Phylogenetic relationship of *Perkinsus olseni* from the Ebro Delta, Spain, to other *Perkinsus* species, based on ribosomal ADN sequences. *Dis. Aquat. Org.*, 86, 135-142.

Encomio, V. G., Stickler, S. M., Allen Jr, S. K. i Chu, F. L. 2005. Performance of "natural dermo-resistant" oyster stocks-survival, disease, growth, condition and energy reserves. *Journal of Shellfish Research*, 24(1), 143-155.

Escobedo-Fregoso, C, Arzul, I., Carrasco N., Gutiérrez-Rivera, JN, Llera-Herrera, R i Vázquez-Juárez, R 2015. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogentic relationship to *P. marinus* along

the Atlantic Coast. *Transboundary and emerging diseases*, 62 (2), 137-147.

Excoffier, L. i Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.

Ferreira, L. P., Sabry, R. C., da Silva, P. M., Gesteira, T. C. V., de Souza Romão, L., Paz, M. P., Galdino Feijó, R.,. Dantas Neto, M. P. i Maggioni, R. 2015. First report of *Perkinsus beihaiensis* in wild clams *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae) in Brazil. *Experimental parasitology*, 150, 67-70.

Ford, S. E., 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the Northeastern United States: response to climate change? *J. Shellfish Res.*, 15, 15-56.

Goggin, C. L. i Lester, R. J. G. 1995. *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Mar. Freshw. Res.*, 46, 639-646.

Grau, A. M., Pastor, E., Pou, S., Riera, F., Reus, L., Reñones, O. 1987. L'Estació d'Aqüicultura del Port d'Andratx. I Jornades del Medi Ambient de les Illes Balears: 159-160.

Grau, A. M. 1989. Aproximació a l'evolució històrica ia la situació actual del marisc o el marisqueig a Maó (Menorca). Jornades sobre conservació i desenvolupament a Menorca, 29-30.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.

Howard, D.W. i Smith, C.S. 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks. National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, Northeast Fisheries Center.

Leethochavalit, S. Chalermwat, K., Upatham, E.S., Choi, K.S., Sawangwong, P. i Kruatrachue, M. 2004. Occurrence of *Perkinsus* sp. in undulated surf clams *Paphia undulata* from the Gulf of Thailand. *Dis Aquat. Org.*, 60, 165-171.

Lester, R. J. G. i Davis, G. H. G. 1981. A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *J. Invertebr. Pathol.*, 37, 181-187.

Librado, P. i Rozas, J. 2009. DnaSp v5: a software for comprehensive analysis of ADN polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.

Mackin, J. G. i Hopkins, S. H. 1962. Studies on oyster mortality in relation to natural environment and to oil fields in Louisiana. *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Tex.*, 7, 3-131.

Moss, J. A., Burreson, E. M., Cordes, J. F., Dungan, C. F., Brown, G. D., Wang, A., Wu, X. i Reece, K. S. 2007. Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Cheasapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.*, 77, 207-223.

Moss, J. A., Xiao, J. I. E., Dungan C. F. i Reece, K. S. 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of southern China. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 55, 117-130.

Murrell, A., Kleeman, S. N., Barker S. C i Lester, R. J. G. 2002. Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester and Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, 22, 258-265.

OIE 2015. Manual de pruebas de diagnòstico para los animales acuáticos. htp://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico.

Oliver, L. M., Fisher, W. S., Ford, S. E., Calvo, L. M., Burreson, E. M., Sutton, E. B. i Gandy, J. 1998. *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. *Dis. Aquat. Org.*, 34, 51-61.

Park, K. I., Choi, K. S. i Choi, J. W. 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Komsoe bay, Korea. *J. Korean Fish. Soc.*, 32, 303-309.

Park, K. I. i Choi, K. S. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture*, 203, 9-22.

Park, K.I., Park, J.K., Lee,J. i Choi, K.S. 2005. Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Dis. Aquat. Org*., 66, 255-263.

Park, K. I., Ngo, T. T., Choi, S. D., Cho, M. i Choi, K. S. 2006. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. *Journal of invertebrate pathology*, 93(2), 81-87.

Pecher, W. T., Alavi, M. R., Schott, E. J., Fernández-Robledo, J. A., Roth, L., Berg S. T. i Vasta, G. R. 2008. Assessment of the northern distribution range of selected *Perkinsus* species in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*) with the use of PCR-based detection assays. *J. Parasitol*,. 94, 410-422.

Powell, E. N., Klinck, J. M. i Hofmann, E. E. 1997. Modeling diseased oyster populations. 2. Triggering mechanisms for *Perkinsus marinus* epizootics. *J. Shellfish Res.*, 15, 141-165.

Ragone, L. M. i Burreson, E. M., 1994. Characterization of overwintering infections of *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in Chesapeake Bay oysters. *J. Shellfish Res*., 13, 123-130.

Ramilo A., Villalba, A., Ceschia, G. i Abollo, E. 2010. Molecular identification of *Perkinsus* species (Protozoa) infecting commercial bivalves in Mediterranean waters. *Aquaculture Europe 2010.* 1077-1078.

Ramilo, A., Carrasco, N., Reece, K. S., Valencia, J. M., Grau, A., Aceituno, P., Rojas, M., Gairin, I., Furomes, M. D., Abollo, E. i Villalba, A. 2015. Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp.(Protista) in new locations and hosts. *Journal of invertebrate pathology*, 125, 37-41.

Ray, S. M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*. *Rice Inst. Pamphlet*, 41, 1-114.

Ray, S. M. 1966. A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, 54, 55-69.

Reece, K. S., Siddall, M. E,. Burreson, E. M. i Graves, J. E. 1997. Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *J. Parasitol.*,. 83, 417-423.

Reece, K. S., Dungan, C. F. i Burreson, E. M. 2008. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in the Chesapeake Bay, USA. *Dis. Aquat. Org.*, 82, 237-248.

Sabry, R. C., Rosa, R. D., Magalhaes, A. R. M., Barracco, M. A., Gesteira, T. C. V. i da Silva, P. M. 2009. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. *Dis. Aquat. Org.*, 88, 13-23.

Saldarriaga, J. F., McEwan, M. L., Fast, N. M., Taylor, F. J. i Keeling, P. J. 2003. Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *Internat. J. System. Evolut. Microbiol*., 53, 355-365.

Sanil, N. K., Vijayan, K. K., Kripa, V. i Mohamed, K. S. 2010. Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the southeast coast of India. *Aquaculture*, 299, 8-14.

Sanil, N. K., Suja, G., Lijo J. i Vijayan, K. K. 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. *Dis. Aquat. Org.*, 98, 209-220.

Santmartí, M. M., García-Valero, J., Montes, J. F., Pech A. i Durfort, M. 1995. Seguimiento del protozoo *Perkinsus* sp., en las poblaciones de *Tapes decussatus y Tapes semidecussatus* del delta del Ebro. *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, 260-265.

Sheppard, B.J. i Phillips, A. C. 2008. *Perkinsus olseni* detected in Vietnamese aquacultured reef clams *Tridacna crocea* imported to the USA, following a mortality event. *Dis. Aquat. Org*., 79, 229-235

Siddall, M. E., Reece, K. S., Graves, J. E. i Burreson, E. M. 1997: 'Total evidence' refutes the inclusion of *Perkinsus* species in

the phylum Apicomplexa. *Parasitol.*, 2, 165-176.

Soniat, T. M., 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.*, 15, 35-44.

Tajima, F. i Nei, M. 1984, Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 1, 269-285.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. i Kumar, S. 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731-2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. i Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.

Valencia, J. M. 2010. Second record of *Perkinsus mediterraneus* in Balearic Islands, Spain, Western mediterranean. *Aquaculture Europe 2010*, 1326-1327.

Valencia, J. M., Bassitta, M., Picornell, A., Ramon, C. i Castro, J. A. 2014. New data on *Perkinsus mediterraneus* in the Balearic Archipelago: locations and affected species. *Diseases of aquatic organisms*, 112(1), 69-82.

Vilas, R., Cao, A., Pardo, B. G., Fernandez, S., Villalba, A. i Martínez, P. 2011. Very low microsatellite polymorphism and large heterozygote deficits suggest founder effects and cryptic structure in the parasite *Perkinsus olseni*. *Infect. Genet. Evol.*, 11, 904-911.

Villalba, A., Reece, K. S., Camino Ordás, M., Casas, S. M. i Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, 17, 411-432.

Villalba, A., Casas, S. M., López, C. i Carballal, M. J. 2005. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Dis. Aquat. Org.*, 65, 257-267.

Vizuete, F., Martinez, P. i Mas, J. 1993. Estudio del ciclo reproductivo de *Chamelea gallina* L., en la bahía de Mazarrón (SE de la península Ibérica). *Publ. Espec. Inst. Esp. Oceanogr.*, 11, 49-55.

Zhang, X, Liang, Y., Fan, J., Zhang, W., Pu, H., Liang, B., Chen, H. i Song, L. 2005. Identification of *Perkinsus*-like parasite in Manila clam, *Ruditapes philippinarum* using ADN molecular marker at ITS region. *Acta Oceanologica Sinica*, 24, 139-144.